

2013년 8월
박사학위논문

위 샘암종에서 EZH2, p16,
Ki-67 발현의 의의

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

최 명 자

위 샘암종에서 EZH2, p16,
Ki-67 발현의 의의

Significance of EZH2, p16 and Ki-67 expression in
gastric adenocarcinoma

2013년 8월 23일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

최 명 자

위 샘암종에서 EZH2, p16, Ki-67 발현의 의의

지도교수 이 미 자

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2013년 4월

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

최 명 자

최명자의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 기근홍 印
위원 조선대학교 교수 임성철 印
위원 조선대학교 교수 김은영 印
위원 조선대학교 교수 홍란 印
위원 조선대학교 교수 이미자 印

2013년 6월

조선대학교 대학원

목 차

표목차	ii
도목차	iii
초 록	1
I. 서론	3
II. 연구재료 및 방법	5
III. 결과	8
IV. 고찰	10
V. 결론	13
참고문헌	14
표	18
그림	24

표 목 차

Table 1. Primary antibodies used in this study

Table 2. Correlation between EZH2 expression and clinicopathologic factors in gastric adenocarcinoma

Table 3. Correlation between p16 expression and clinicopathologic parameters in gastric adenocarcinoma

Table 4. Correlation between Ki-67 expression and clinicopathologic factors in gastric adenocarcinoma

Table 5. Correlation among EZH2, p16 and Ki-67 expression in gastric adenocarcinoma

Table 6. Univariate analysis of overall survival rate according to clinicopathologic factors in gastric adenocarcinoma

Table 7. Multivariate analysis of overall survival in gastric adenocarcinoma

도 목 차

Fig. 1. Immunostaining for EZH2 shows high expression in normal gastric mucosa (upper left of A), intestinal type (lower right of A) and diffuse type (B) of gastric adenocarcinoma.

Fig. 2. Immunostaining for p16 shows focal positive in normal gastric mucosa (right of A) and negative (left of A) or positive (B) in gastric adenocarcinoma.

Fig. 3. Immunostaining for Ki-67 shows focal positive in normal gastric mucosa (right of A) and positive (score 3, left of A and B) in gastric adenocarcinoma.

ABSTRACT

Significance of EZH2, p16 and Ki-67 Expression in Gastric Adenocarcinoma

Choe, Myoung Ja

Advisor : Prof. Lee, Mi Ja

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Background: At the molecular level, gastric tumors arise from multiple genetic and epigenetic alterations that involve oncogenes, tumor suppressor genes, cell cycle regulators, cell adhesion molecules and DNA repair genes. The enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a member of the polycomb group of protein, plays an important role in cell proliferation and cell cycle regulation. EZH2 was overexpressed in aggressive forms of prostate, breast, bladder and endometrial cancers. p16 gene is implicated in pathogenesis of many human tumors and even in regulation of normal cellular growth, together with tyrosine kinases and tumor transforming growth factors. This study aimed to evaluate the clinicopathologic significance of the expression of three proteins, EZH2 (tissue development and differentiation), p16 (crucial to cell-cycle control) and Ki-67 in patients with gastric adenocarcinoma. **Methods:** The expression patterns were examined by immunohistochemistry in 115 patients. The results were compared with both clinicopathologic factors (age, sex, Lauren classification type, histologic grade, tumor size, pT category, lymph node metastasis and stage) and the overall survival. **Results:** The expression of EZH2, p16 and Ki-67 was not correlated with any clinicopathologic factors. High expression of EZH2 was

significantly correlated with score of Ki-67 expression in gastric adenocarcinoma. Multivariate analysis showed that tumor location, histologic grade, pT, pN and loss of p16 expression had a significant correlation with survival. **Conclusion:** These results demonstrated that correlation between loss of p16 expression, tumor location, histologic grade and pT, and survival was found. Therefore p16 expression may be an additional prognostic marker, and provides useful information for survival in gastric cancer patients. The significance of relationship between EZH2 and Ki-67 expression will be needed to determine by additional research in future.

Key Words : Gastric adenocarcinoma, EZH2, p16, Ki-67, Survival

I. 서 론

위암은 우리나라에서 2010년 기준으로 전체 암 종별 비교 시 발생률과 유병률에서 2위, 사망률로는 인구 10만 명 당 13.6명으로 세 번째로 높은 질환이다.¹ 위암의 조기진단과 치료에 많은 발전이 이루어졌으나 아직도 해결해야 할 과제가 남아 있다. 그 중에서 분자 수준에서의 위암 발생의 규명은 암의 진단과 치료 및 예후 결정에 중요한 정보를 제공해줄 것으로 기대 된다.² 암 발생은 오랜 기간에 걸쳐 단계적으로 이루어지며 세포의 과다 증식, 유전자 불안정성, 세포사멸기전 불활성화 같은 중요한 요인들이 복합적으로 관여되어 있다. 이중 세포주기 조절기전 이상으로 인한 세포의 과다 증식은 다단계 발암과정(carcinogenesis)의 시발점으로 간주되는데 이는 세포주기 조절유전자가 암세포 성장을 촉진하는 암유전자(oncogene)나 암세포 성장을 억제하는 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)로서의 역할을 하기 때문이다.^{3,4}

EZH2는 초과리의 'Enhancer of Zeste' 단백질과 같은 배열을 보여주는 것으로 확인된 핵단백이고 polycomb 그룹의 단백질 구성요소로 간주된다.⁵ 또한 EZH2가 시험관과 체내에서 pRb2/p130과 상호작용 한다는 것을 확인하였고 이 단백질-단백 상호작용의 기능은 pRb2/p130의 cyclin A같은 세포주기 촉진유전자에 대한 억제활동에 관여 하는데 이것은 EZH2 발현에 따라 pRb2/p130 기능을 비활성화 시키는 새로운 메카니즘의 밑바탕이 되는 것이다.⁶ 또한 EZH2는 염색질 재구성에 참여함으로써 유전자 발현조절에 관여하여 발달중인 배아에서 넓게 발현되고 조직성숙과 분화에 따라 쇠퇴한다. EZH2는 가장 공격적 형태의 전립선암에서 과발현되는 것으로 나타나 임상결과와의 상관성을 보여 주었으며 이런 형태의 암에서 공격성과 좋지 않은 예후의 새로운 표지자로서 역할을 제시하였다.⁵

p16 유전자는 9번 염색체에 존재하며 세포주기를 억제 조절하는데 관여하는 cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor이다. 이것은 세포주기 및 증식에 관여하는 CDK4/6와 결합하여 촉매활동을 억제하며 이 과정에서 세포분열 시기가 합성전기(late G1 phase)에서 합성기(S phase)로 유입되지 않음으로서 DNA 합성 과정을 거치지 못하게 하는 역할을 한다.⁷ 염색체 9p21 위치에는 p16과 같은 종양억제유전자로 알려진 p15 (INK4B)와 p14 (ARF)는 p16 (INK4A)과 alternative splicing에 의

해 encode되는 유전자이며,^{8,9} MDM2-p53 complex와 결합하여 p53의 저하를 억제시키는 것으로 알려져 있다.^{10,11}

Ki-67은 핵단백으로 G₀와 초기 G₁을 제외한 모든 세포 주기에 발현되는 감수성과 특이성이 높은 세포증식에 대한 대표적인 표지자로 알려져 있다.¹² 세포의 증식력은 악성 종양의 생물학적 특징을 결정짓는 대표적인 요인의 하나로 알려져 있다. Ki-67은 세포의 증식과정에서 휴지기인 G₀시기를 제외한 G₁기, S기 및 M기 등 주로 세포주기의 활성기에 출현하므로 Ki-67 발현이 많은 종양은 빠른 증식을 보이며 생물학적 형태상 악성도가 높은 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁶

본 연구에서는 다양한 유전자의 발현의 면역조직화학적 검사로 악성 위암의 이해와 예측에 도움이 될 수 있는 증거를 찾아보고 위 샘암종 진행에 관련된 분자적 메커니즘을 밝히기 위해 EZH2, p16 및 Ki-67의 발현 정도와 임상병리학적 인자와의 상관성을 평가하며 환자 생존율과 연관시켜 위 샘암종 조직에서 이들 단백질 발현의 임상병리학적 의미를 알아보고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

A. 연구 재료

본 연구는 2002년 1월부터 2003년 12월까지 조선대학교 병원에서 위 샘암종으로 진단받고 외과적 절제술을 시행한 환자 중 파라핀 포매 조직이 보관되어 있는 115예를 대상으로 하였다. 수술 전에 항암요법이나 방사선치료를 받은 경우는 제외하였다.

B. 연구 방법

1. 임상소견 및 병리조직학적 검색

선택한 환자의 임상 기록, 병리 진단지와 조직검사 슬라이드 등을 재검토하여 환자의 나이와 성별을 조사하였다.

Lauren 분류¹⁷에서 장형 55예(55.4%), 미만형 44예(33.8%), 혼합형 16예(10.8%)였다. 암종의 위치는 위 상부 1/3에 10예(6.4%), 중간 1/3에 45예(35.1%), 하부 1/3에 50예(52.8%), 위 전체에 8예(5.7%)였다. 종양의 조직학적 분화는 WHO 분류¹⁸에 따라 고분화형, 중분화형 및 저분화형으로 분류하였을 때 고분화형 6예(7.6%), 중분화형 47예(40.1%), 저분화형 62예(52.3%)였다. 종양의 크기는 5 cm 미만과 5 cm 이상으로 분류하였는데 5cm 미만 83예(72.3%), 5cm 이상 32예(27.7%)였다.

원발 종양의 침윤 깊이(pT)는 AJCC (American Joint Committee on Cancer)의 Cancer Staging Manual¹⁹에 따라 점막과 점막하 침윤(pT1), 고유근육 침윤(pT2), 장막하 침윤(pT3), 장막을 뚫었거나 인접한 장기나 구조로 침윤(pT4)으로 분류하였다. 림프절 전이여부는 전이가 없는 경우(pN0), 1-2개 림프절 전이가 있는 경우(pN1), 3-6개 림프절 전이가 있는 경우(pN2)와 7개 이상 림프절 전이가 있는 경우

(pN3)로 분류하였다.

그 결과 원발 종양의 침윤 깊이는 pT1이 29예(40.8%), pT2가 19예(12.1%), pT3는 34예(26.1%), pT4는 33예(21.0%)였다. 림프절 전이는 pN0가 44예(51.6%), pN1이 19예(13.4%), pN2가 26예(18.4%), pN3가 26예(16.6%)였다. 병기는 I군이 38예(49.7%), II군이 26예(17.8%), III군이 51예(32.5%)였다.

2. 면역조직화학 검사

본 연구에 사용된 1차 항체는 표 1에 요약되어 있다. 선택한 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 면역염색용 슬라이드에 부착하였다. 면역염색은 자동화 면역염색기(Benchmark XT, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA)로 시행하였으며, UltraVeiw Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems Inc.)를 이용하였다. 사용한 일차항체는 자동화 면역염색기(42 $^{\circ}$ C)에서 1시간동안 반응시킨 후 헤마톡실린으로 대조염색 하였다. 이 슬라이드를 다시 80%, 90%, 100%의 알코올에 차례대로 3분씩 담가 탈수시킨 후 Xylene에 담갔다가 봉입하였다.

3. 면역조직화학적 염색의 판정

염색결과 판정은 환자의 임상병리학적 인자에 대한 사전 정보가 없는 상태에서 이루어졌다. EZH2는 세포핵에 염색되는 경우가 전체 암세포의 50% 미만이면 저발현(low)으로, 50% 이상이면 고발현(high)으로 평가하였다.²⁰ p16은 핵 또는 핵과 세포질에 염색되는 경우를 판정하고 전체 종양세포 중 양성을 보이는 종양세포가 10% 미만이면 음성반응(negative)으로 소실된 것으로 판정하였으며, 10% 이상이면 양성반응(positive)으로 발현으로 판정하였다.²¹ Ki-67 염색은 핵에 뚜렷하게 염색되는 경우를 판정하였으며 종양세포의 염색범위를 네 등급(score 0 : <1%, score 1 : 1-25%, score 2 : 26-50%, score 3 : 51-100%)으로 평가하였다.²¹

4. 통계학적 분석

EZH2, p16 및 Ki-67 발현과 임상병리학적 인자들과의 상관성은 Pearson Chi-square test로 검정하였고, EZH2, p16 및 Ki-67 발현간의 상관성은 교차분석 후 Fisher's exact test로 검증하였다. 생존률 분석은 다변량 생존 분석법 (multivariate survival analysis)으로 검정하였으며 SAS 프로그램 (version 9.2)을 사용하였다. 통계적 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 이루어 졌다.

III. 결 과

1. EZH2 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의

위 샘암종 115예 중 EZH2 단백질은 57예(49.6%)에서 고발현(Fig. 1)을 보였으며, EZH2 단백질발현 정도와 여러 임상병리학적 인자들과의 상관성을 분석하였을 때(표 2) 나이 요인을 제외하곤 상관성이 없었다. 환자의 나이가 60세 이상일수록 발현이 감소하였다($p=0.02$).

2. p16 면역조직화학적 발현과 임상병리학적 의의

위 샘암종에서 p16 단백질 발현은 70예(60.9%)에서 양성으로 발현되었다(Fig. 2). 그러나 p16 단백질 발현 유무와 여러 임상병리학적 인자들(나이, 성별, 종양의 위치, Lauren 분류, 조직학적 분화도, 침윤의 깊이, 림프절 전이 등)과의 상관성은 없었다.(표 3)

3. Ki-67 면역조직화학적 발현과 임상병리학적 의의

Ki-67 단백질은 종양세포의 핵에서 양성(Fig. 3)을 보였다. Ki-67 단백질 발현의 결과를 분석해 보았을 때 Lauren 분류의 장형에서 54.5%, 조직학적 분화가 나쁜 군에서 48.4%로 score 3 발현이 다른 인자에서 보다 높았지만 통계학적 유의성은 없었다.(표 4)

4. EZH2, p16 및 Ki-67 단백질 간의 상관성

위 샘암종에서 EZH2, p16과 Ki-67 단백질 간의 상관성을 비교해 보았을 때 EZH2 단백질과 Ki-67 단백질 발현 간에는 서로 비례하는 상관성($p=0.01$)을 보였는데 EZH2

발현이 증가하면 Ki-67 발현도 증가하였고, 높은 Ki-67 발현은 EZH2 고발현과 관계가 있었다. 그러나 p16 단백질과 Ki-67 단백질 발현 간에는 상관성이 없었다.

5. 임상병리학적 인자와 생존율과의 다변량 분석

생존여부에 대한 추적기간은 5-7년이였다. 생존여부와 생존기간을 조사한 115명 환자들의 생존율은 53.8%였다. 생존율과 환자의 나이 및 성별, Lauren 분류, 종양의 위치, 조직학적 분화도, 종양의 크기, 종양의 침윤 깊이(pT), 림프절 전이수(pN), 병기와의 상관성을 서로 비교한 다변량 분석을 보았을 때 종양의 위치, 종양의 침윤깊이, 조직학적 분화도, 림프절 전이와 p16 발현 소실이 생존여부와 상관성이 있었다.(표 6) 기존에 알려진 임상병리학적 인자 외에 p16 단백질 발현이 음성인 경우 생존율이 감소함을 보였다.

IV. 고 찰

위암은 전 세계적으로 질병과 사망의 주요 원인이다. 특히 한국에서의 위암은 암 발생률 및 유병률 2위이고 사망 원인 중에서는 3위를 차지하고 있다.¹ 가장 신뢰할 수 있는 예후 인자는 종양의 병기이다. 종양의 등급과 조직학적 분화도 또한 유용한 요소일 수 있다. 위 샘암종을 포함한 암종의 진행은 다단계 과정을 거치며 암이 진행되는 동안 세포 내에서 유전적 변이의 순차적 축적이 이루어진다.¹⁵ 세포증식은 cyclin과 CDKs로 구성된 단백 복합체에 의해 제어되는 세포주기를 통해 조직적이고 시간적으로 제어된 진행을 따른다.²² 그 세포주기 초기 및 후기 G₁ 단계 사이, 그리고 S 및 G₂/M단계 사이에 있는 체크포인트에 의해 결정되는데 세포주기 제어의 주요 기여는 p16, p21, p27 같은 CDK 억제인자에서 나온다.¹⁵

유전자 전사 억제제로 알려진 EZH2 단백질의 과발현은 전립선암 및 유방암, 방광암, 자궁암 등 다양한 악성종양과 관련이 있다고 보고되고 있다.^{15,23} EZH2는 정상 조직보다 암조직에서 더 높이 발현 되었고 그 발현 정도는 종양의 크기와 침투의 깊이, 혈관침윤, 림프절 전이 및 임상단계와 상관성이 높은 것으로 나타났다.^{5,24} EZH2 기능은 histone을 메틸화하여 polycomb 억제복합체의 하부 단위를 촉매화하는 것이다. Polycomb 그룹 단백질은 암 진행 뿐 만 아니라 배아와 성체줄기세포 유지에 기여하는 염색질 변화 인자이다. EZH2는 그 자체로서는 효소 활동이 부족하지만 여러 기관에서 억제유전자로서 기능하는 EZH2 복합체를 만들고 polycomb 억제복합체와 특정 폴리펩티드와 관련이 있다고 추정된다.²⁵ 또한 EZH2 과발현과 전립선암의 진행사이에 밀접한 상관관계가 보고되었다.⁵ Matsukawa 등²⁴의 연구에서는 EZH2의 발현정도가 높은 위암 환자가 EZH2 발현이 안 되었거나 낮은 위암 환자보다 만족스럽지 못한 예후를 가지는 것을 보여 주었다. 또한 EZH2 발현은 위암 세포로 국한되고 정상 위 점막은 EZH2 면역반응성을 미약하게 보이거나 전혀 보여 주지 않았으며 샘 상피세포의 핵에 국한되었다고 보고하였다. 이러한 연구 결과로 EZH2의 과발현은 위암의 발암과 진행에 영향을 미치는 것을 알 수 있으며 EZH2가 새로운 바이오마커로 사용될 수 있음을 암시하였다. Mattioli 등¹⁵의 연구에서는 높은 수준의 EZH2를 발현하는 종양들은 더 공격적인 생물학적 행태와 상관성이 있다는 것을 발견하였다. 위암 조직에서 높은 수준의 EZH2 발현은 전이의 발

생과 유의미하게 관련이 있었는데 이것은 위암종 확산에 있어서 이 단백질의 가능한 역할을 나타낸다.

그러나 본 연구에서는 위 샘암종 115예 중 EZH2 단백질의 고발현은 57예(49.6%)에서 보였으나 나이 요인을 제외한 여러 임상병리학적 인자들과의 상관성은 없었다. 또한 생존율과의 상관성도 관찰되지 않아 새로운 예후인자로서의 의미를 제시하지 못하였다. 그러므로 이를 분명히 규명하기 위해서는 더 많은 위암환자 조직을 이용한 추후 연구가 필요하리라 생각한다.

유방암을 비롯한 흑색종, 신경교종, 백혈병, 췌장암 등에서 자주 관찰되는 p16 유전자의 이상소견은 주로 점돌연변이, 이형접합 상실 및 동형접합 결실 등이다. 또한 p16 단백질의 불활성화 상태도 보고되고 있다.^{26,27} 그러나 원발성 위암에서는 p16 유전자 변이의 빈도가 매우 낮다고 알려져 있다.^{28,29} p16 유전자의 불활성화의 기능이 소실되면 세포주기 진행이 억제되지 않아 결국 과도한 세포분열이 초래되어 세포수가 비정상적으로 증가한 것이 암 발생의 중요한 원인으로 밝혀짐에 따라 p16 유전자를 도입시킴으로써 암세포 성장을 억제하고자 하는 유전자 치료법이 각광을 받고 있다.^{30,31} p16 단백질은 pRb 기능이 결여된 세포들에서 과발현되고 피드백 루프에 참여할 수 있는데 거기서 pRb에 의한 p16 발현의 억제는 CDK4가 인산화 되고 pRb를 억제하도록 허용한다. p16 단백질은 구체적으로 CDK4와 CDK6을 억제하고 그것들의 활동을 억제하는 것에 의해 pRb를 비활성화 시킨다.¹⁵ 한국인 위암세포주인 SNU 484 암세포에 정상 p16 유전자를 도입한 결과 암세포 성장이 2배 느려졌으며 세포의 크기가 커졌다.³⁰ 암세포가 커지면서 성장속도가 느려지는 것은 분화된 암조직의 형태학적 특징 중 하나이며 분화된 암조직은 치료 예후도 좋은 것으로 보고되고 있다.³¹ 위암에서 p16 발현의 결핍은 p16 프로모터 영역의 과메틸화에 의한 불활성화가 주요한 기전으로 p16 유전자의 제거가 위암 분화와 전이의 정도에 관련이 있다는 것을 보여 주었다.²⁰ 반면에 Mattioli 등¹⁵의 연구에서는 p16 발현이 임상병리학적 매개 변수들과는 상관성이 없다고 밝혔는데 이것은 본 연구 결과와도 일치한다. 본 연구에서 p16 발현 이상인 소실은 위 샘암종 115예 중 45예(39.1%)에서 보였다. p16 발현 소실은 여러 임상병리학적 인자들과의 상관성은 없었으나 생존율과의 다변량 분석에서 기존의 인자들인 종양의 위치, 종양의 침윤깊이(pT), 조직학적 분화도, 임파절 전이(pN)와 함께 생존율과 상관성을 보여 새로운

예후인자로서의 의미를 제시하였다. 이는 기존의 연구결과^{30,31}에서 나타난 정상 p16 유전자 도입으로 암세포 성장을 억제할 수 있다는 사실을 뒷받침해 주며 p16 유전자 치료법의 가능성을 시사 한다고 생각한다.

Ki-67은 휴지중인 세포에서는 발현하지 않지만 증식중인 세포에서는 발현되는 핵 항원과 반응하는 단클론 항체이다. 이 항원의 발현은 세포주기 중 늦은 G₁ 및 S, G₂, M기 단계에서 우선적으로 발생하지만 G₀ 단계의 세포에서는 항원을 감지할 수 없다. 따라서 항체는 새롭게 발생한 암의 증식세포를 감지하기 위해 중앙병리에 사용된다. Ki-67 표시지수로 단클론 항체 MIB-1을 사용하여 세포성장과 관련된 Ki-67 항원을 면역조직화학적으로 측정하여 계산되며 이것의 긍정적 효과는 위암에서도 평가 되었다.^{32,33} Yabuki 등³⁴은 정상 위조직과 위 샘암종에서 Ki-67과 topoisomerase II를 염색한 결과 상관관계가 있었으며 Ki-67에 대한 양성율이 topoisomerase II의 양성율 보다 높다고 하였다. 담관암에서의 Ki-67 증식능 지수에 대한 연구³⁶에서도 림프절 전이가 있거나 림프관 전이가 있는 환자에서 수치가 의미있게 높아 수술 후 생존율을 저하시키는 중요한 예후 인자라고 주장 하였다. Yonemura 등³⁵은 내시경적 생검으로 얻어진 위암조직에서 Ki-67 표시지수를 측정하고 이를 수술로 절제된 위암의 여러 가지 병리학적 소견과 비교하여 Ki-67 표시지수가 혈관침범 및 림프관 침윤이 있는 군과 림프절 전이가 있는 군에서 상대적으로 높음을 보았고 Ki-67 표시지수가 높은 군이 예후가 좋지 않음을 보고 하였다.

본 연구에서는 Score 3 발현이 Lauren 분류 장형에서, 조직학적 분화도가 나쁜 군에서 다른 군보다 높게 보였지만 통계학적 유의성은 없었다. Mattioli 등¹⁵의 연구에서는 Ki-67과 p16 발현 간에 높은 통계적 상관성이 있었다고 보고 하였으나 본 연구에서는 의미있는 상관성은 없었다. Choi 등²³의 연구에서 높은 EZH2 발현은 Ki-67 및 p53 발현과 상관이 있다고 보고하였으며 Mattioli 등¹⁵도 EZH2의 발현 정도와 Ki-67, p52 및 pRb2/p130 발현 사이에서 의미 있는 상관성이 있다고 하였다. 본 연구에서도 EZH2 발현이 증가하면 Ki-67 발현도 증가하였고 높은 Ki-67 발현은 높은 EZH2 발현으로 양의 상관관계가 관찰되었다. 그러나 이러한 소견들은 더 많은 위암환자 조직을 이용한 추후 연구를 통해 의미를 규명하는 것이 필요하리라 생각한다.

V. 결 론

본 연구는 위암의 진행에 관련된 인자를 밝히기 위해 위 샘암종에서 EZH2, p16 및 Ki-67의 발현의 유용성을 알아보며 위암 환자의 예후를 예견하는데 이용되어 왔던 임상병리학적 인자와의 상관성을 평가하고 환자 생존율과 연관시켜 각 단백질 발현의 임상적인 의미를 알아보고자 하였다. 2002년 1월부터 2003년 12월까지 조선대학교 병원에서 위 샘암종으로 진단받고 외과적 절제술을 시행한 환자 중 파라핀 포매 조직이 보관되어 있는 115예를 대상으로 면역조직화학 염색을 시행하였다. 그 결과 p16 발현 소실은 기존의 인자들인 종양의 위치, 종양의 침윤깊이(pT), 조직학적 분화도, 림프절 전이 상태(pN)와 함께 생존율에서 통계학적으로 유의한 상관성을 보여 새로운 예후 인자로서의 의미가 있음을 제시하였다. 이는 위암 환자에서 정상 p16 유전자 도입을 통한 유전자 치료법의 가능성을 시사한다고 생각한다. EZH2의 고발현과 Ki-67 발현정도는 여러 임상병리학적 인자들 및 생존율과의 상관성이 관찰되지 않아 위암의 예후인자로서의 가치가 낮다고 생각된다. 그러나 이를 분명히 규명하기 위해서는 더 많은 위암환자 조직을 이용한 추후 연구가 필요하리라 생각한다.

참 고 문 헌

1. Ministry for Health, Welfare and Family. Annual report of cancer incidence (2011), cancer prevalence and survival in Korea. <http://www.cancer.go.kr>.
2. Kim JR, Kim SY, Kim MJ, Kim JH. Alterations of CDKN2 (MTS1/p16INK4A) gene in paraffin-embedded tumor tissues of human stomach, lung, cervix and liver cancers. *Exp Mol Med*. 1998; 30: 109-14.
3. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*. 1989; 49: 3713-21.
4. Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol*. 1995; 147: 545-60.
5. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002; 419: 624-9.
6. Tonini T, Bagella L, D'Andrilli G, Claudio PP, Giordano A. Ezh2 reduces the ability of HDAC1-dependent pRb2/p130 transcriptional repression of cyclin A. *Oncogene*. 2004; 23: 4930-7.
7. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996; 274: 1672-7.
8. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res*. 1995; 55: 2988-94.
9. Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res*. 1995; 55: 2995-7.
10. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998; 92: 713-23.

11. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998; 92: 725-34.
12. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991; 138: 867-73.
13. Lu S, Tiekso J, Hietanen S, Syrjänen K, Havu VK, Syrjänen S. Expression of cell-cycle proteins p53, p21 (WAF-1), PCNA and Ki-67 in benign, premalignant and malignant skin lesions with implicated HPV involvement. *Acta Derm Venereol*. 1999; 79: 268-73.
14. Matsuta M, Kimura S, Kosegawa G, Kon S, Matsuta M. Immunohistochemical detection of Ki-67 in epithelial skin tumors in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using a new monoclonal antibody (MIB-1). *J Dermatol*. 1996; 23: 147-52.
15. Mattioli E, Vogiatzi P, Sun A, Abbadessa G, Angeloni G, D'Ugo D, Trani D, Gaughan JP, Vecchio FM, Cevenini G, Persiani R, Giordano A, Claudio PP. Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16(INK4A), p27(KIP1), p21(WAF1), Ki-67 expression patterns in gastric cancer. *J Cell Physiol*. 2007; 210: 183-91.
16. Baum HP, Meurer I, Unteregger G. Ki-67 antigen expression and growth pattern of basal cell carcinomas. *Arch Dermatol Res*. 1993; 285: 291-5.
17. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965; 64: 31-49.
18. Hamilton SR, Aaltonen LA. WHO classification of tumors. Pathology and genetics. Tumors of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2000.
19. Greene FL, Rage DL, Fleing ID, et al. AJCC cancer staging manual. 7th ed.

- New York: Springer-Verlage, 2009.
20. Yasuko M, shuho S, Hirotaka K, Akihiko I, Kaxuyoshi Y and Hiroshi Y. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.* 2006; 97: 484-91.
 21. Eliseo M, Paraskeri V, Ang S, Giovanni A, Giulia A, Domenico D, Daniela T, John P, Favio M, Gavriale C, Roberto P, Antonio G, Pier P. Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16(INK4A), p27(KIP1), p21(WAF1), Ki-67 expression patterns in gastric cancer. *J Cell Physiol.* 2007 Jan; 210(1):183-91.
 22. Tonini T, Hillson C, Claudio PP. Interview with the retinoblastoma family members: do they help each other? *J Cell Physiol.* 2002; 192: 138-50.
 23. Choi JH, Song YS, Yoon JS, Song KW, Lee YY. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer. *APMIS.* 2010; 118: 196-202.
 24. Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.* 2006; 97: 484-91.
 25. Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell.* 2002; 111: 197-208.
 26. Takaoka AS, Kakiuchi H, Itoh F, Hinoda Y, Kusano M, Ohara M, Tsukakoshi H, Hosokawa M, Imai K. Infrequent alterations of the p16 (MTS-1) gene in human gastric cancer. *Tumour Biol.* 1997; 18: 95-103.
 27. Günther T, Schneider-Stock R, Pross M, Manger T, Malferttheiner P, Lippert H, Roessner A. Alterations of the p16/MTS1-tumor suppressor gene in gastric cancer. *Pathol Res Pract.* 1998; 194: 809-13.
 28. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 1994; 264:

- 436-40.
29. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994; 368: 753-6.
 30. Jeong YW, Kim KS, Oh JY, Park JC, Baek WK, Suh SI, Suh MH, Lee JC, Cho JW. Exogenous wild-type p16INK4A gene induces delayed cell proliferation and promotes chemosensitivity through decreased pRB and increased E2F-1 expressions. *Int J Mol Med*. 2003; 12: 61-5.
 31. Allay JA, Steiner MS, Zhang Y, Reed CP, Cockroft J, Lu Y. Adenovirus p16 gene therapy for prostate cancer. *World J Urol*. 2000; 18: 111-20.
 32. Schipper DL, Wagenmans MJ, Peters WH, Wagener DJ. Significance of cell proliferation measurement in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 1998; 34: 781-90.
 33. Igarashi N, Takahashi M, Ohkubo H, Omata K, Iida R, Fujimoto S. Predictive value of Ki-67, p53 protein, and DNA content in the diagnosis of gastric carcinoma. *Cancer*. 1999; 86: 1449-54.
 34. Yabuki N, Sasano H, Kato K, Ohara S, Toyota T, Nagura H, Miyaike M, Nozaki N, Kikuchi A. Immunohistochemical study of DNA topoisomerase II in human gastric disorders. *Am J Pathol*. 1996; 149: 997-1007.
 35. Yonemura Y, Ooyama S, Sugiyama K, Kamata T, De Aretxabala X, Kimura H, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma. *Cancer Res*. 1990; 50: 509-14.
 36. Murakami M, Sasaki T, Kuwada Y, Yamasaki K, Chayama K. Prognostic value of p53 and Ki-67 expression in resected pre biopsy specimens of bile duct carcinoma. *Oncol Rep*. 2003; 10: 1091-6.
 37. Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shiozaki H, Monden M. Expression of tumor suppressor gene p16 products in primary gastric cancer. *Oncology*. 2000; 58: 126-136.

Table 1. Primary antibodies used in this study

Antibody	Dilution	Type	Source
EZH2	1:200	polyclonal	Invitrogen coporation, CA
p16	1:200	polyclonal	Ventana Medical, Arizona
Ki-67	1:100	monoclonal	Ventana Medical, Arizona

Table 2. Correlation between EZH2 expression and clinicopathologic parameters in gastric adenocarcinoma

		EZH2 expression			<i>p</i> -value
		Total (n=115)	Low (n=58)	High (n=57)	
Age (yr)	< 60	52	20	32	0.02*
	≥ 60	63	38	25	
Sex	Male	74	39	35	0.51
	Female	41	19	22	
Lauren type	intestinal	55	22	33	0.07
	diffuse	44	25	19	
	mixed	16	11	5	
Location	upper third	10	3	7	0.27
	middle third	45	24	21	
	lower third	50	24	26	
	entire	10	8	2	
Histologic grade	well	6	4	2	0.18
	moderately	47	19	28	
	poorly	62	35	27	
Tumor size (cm)	< 5	72	37	35	0.28
	≥ 5	43	19	24	
Depth of invasion	pT1	29	13	16	0.62
	pT2	19	12	7	
	pT3	34	16	18	
	pT4	33	17	16	
LN metastasis	pN0	44	21	23	0.93
	pN1 (1-2)	19	9	10	
	pN2 (3-6)	26	14	12	
	pN3 (≥ 7)	26	14	12	
Stage	I	38	20	18	0.64
	II	26	11	15	
	III	51	27	24	

Low : <50% of cancer cells, High : ≥50% of cancer cells and intense

* *p* > 0.05

Table 3. Correlation between p16 expression and clinicopathologic factors
in gastric adenocarcinoma

		p16 expression			<i>p</i> -value
		Total (n=115)	negative (n=45)	positive (n=70)	
Age (yr)	< 60	52	19	33	0.60
	≥ 60	63	26	37	
Sex	Male	74	29	45	0.99
	Female	41	16	25	
Lauren type	intestinal	55	18	37	0.31
	diffuse	44	21	23	
	mixed	16	6	10	
Location	upper third	10	3	7	0.80
	middle third	45	18	27	
	lower third	50	20	30	
	entire	10	4	6	
Histologic grade	well	6	4	2	0.21
	moderately	47	15	32	
	poorly	62	26	36	
Tumor size (cm)	< 5	72	24	48	0.22
	≥ 5	43	23	20	
Depth of invasion	pT1	29	9	20	0.71
	pT2	19	9	10	
	pT3	34	14	20	
	pT4	33	13	20	
LN metastasis	pN0	44	15	29	0.31
	pN1 (1-2)	19	5	14	
	pN2 (3-6)	26	13	13	
	pN3 (≥ 7)	26	12	14	
Stage	I	38	13	25	0.50
	II	26	9	17	
	III	51	23	28	

Table 4. Correlation between Ki-67 expression and clinicopathologic factors in gastric adenocarcinoma

		Score of Ki-67 expression					<i>p</i> -value
		Total (n=115)	0 (n=1)	1 (n=21)	2 (n=39)	3 (n=54)	
Age (yr)	< 60	52	0	7	22	23	0.25
	≥ 60	63	1	14	17	31	
Sex	Male	41	1	8	15	17	0.49
	Female	74	0	13	24	37	
Lauren type	intestinal	55	0	9	16	30	0.49
	diffuse	44	1	10	15	18	
	mixed	16	0	2	8	6	
Location	upper third	10	0	3	1	6	0.69
	middle third	45	1	7	17	20	
	lower third	50	0	9	18	23	
	entire	8	0	2	1	5	
Histologic grade	well	6	0	2	2	2	0.92
	moderately	47	0	9	16	22	
	poorly	62	1	10	21	30	
Tumor size (cm)	< 5	72	0	14	22	36	0.97
	≥ 5	28	0	5	9	14	
Depth of invasion	pT1	29	0	6	12	11	0.09
	pT2	19	1	1	4	13	
	pT3	34	0	9	8	17	
	pT4	33	0	5	15	13	
LN metastasis	pN0	44	1	7	14	22	0.84
	pN1 (1-2)	19	0	4	8	7	
	pN2 (3-6)	26	0	7	8	11	
	pN3 (≥ 7)	26	0	3	9	14	
Stage	I	38	1	6	13	18	0.85
	II	26	0	5	10	11	
	III	51	0	10	16	25	

Table 5. Correlation among EZH2, p16 and Ki-67 expression in gastric adenocarcinoma

		Score of Ki-67 expression (%)				<i>p</i> -value
		1	2	3	Total	
EZH2	Low	16 (13.9)	23 (20.0)	19 (16.5)	58 (50.4)	0.005*
	High	6 (5.1)	16 (14.0)	35 (30.5)	57 (49.6)	
	Total	22 (19.0)	39 (34.0)	54 (47.0)	115 (100)	
p16	Negative	9 (7.8)	16 (13.9)	20 (17.4)	45 (39.1)	0.910
	Positive	13 (11.3)	23 (20.0)	34 (29.6)	70 (60.9)	
	Total	22 (19.1)	39 (33.9)	54 (47.0)	115 (100)	

* $p > 0.05$

Table 6. Multivariate analysis of overall survival in gastric adenocarcinoma

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> value
Age (≥ 60 / < 60)	0.76	0.37-1.52	0.44
Sex (male / female)	2.06	0.96-4.42	0.06
Tumor size (≥ 5 / < 5)	0.83	0.39-1.74	0.61
Location (middle / upper)	1.47	0.44-4.92	0.54
(low / upper)	0.76	0.23-2.49	0.65
(entire / upper)	15.26	3.15-73.87	0.00
Depth of invasion (pT2 / pT1)	3.49	0.82-14.86	0.09
(pT3 / pT1)	4.23	0.58-30.81	0.16
(pT4 / pT1)	17.91	1.98-162.01	0.01*
Histologic grade (grade 2 / grade 1)	0.18	0.04-0.74	0.02*
(grade 3 / grade 1)	0.09	0.02-0.49	0.01*
Lauren type (diffuse / intestinal)	1.79	0.49-6.50	0.37
(mixed / intestinal)	1.93	0.57-6.48	0.29
LN metastasis (pN1 / pN0)	1.42	0.36-5.56	0.61
(pN2 / pN0)	2.37	0.26-21.38	0.44
(pN3 / pN0)	9.84	0.96-100.92	0.05*
Stage (Stage 2 / Stage 1)	2.15	0.28-16.82	0.46
(Stage 3 / Stage 1)	0.22	0.01-7.22	0.40
EZH2 (High / Low)	1.52	0.68-3.41	0.31
p16 (negative / positive)	0.47	0.22-0.00	0.04*
Ki-67 (score 2, 3 / score 1)	0.84	0.37-1.90	0.67

HR : Hazard ratio, CI : Confidence interval

* $p > 0.05$

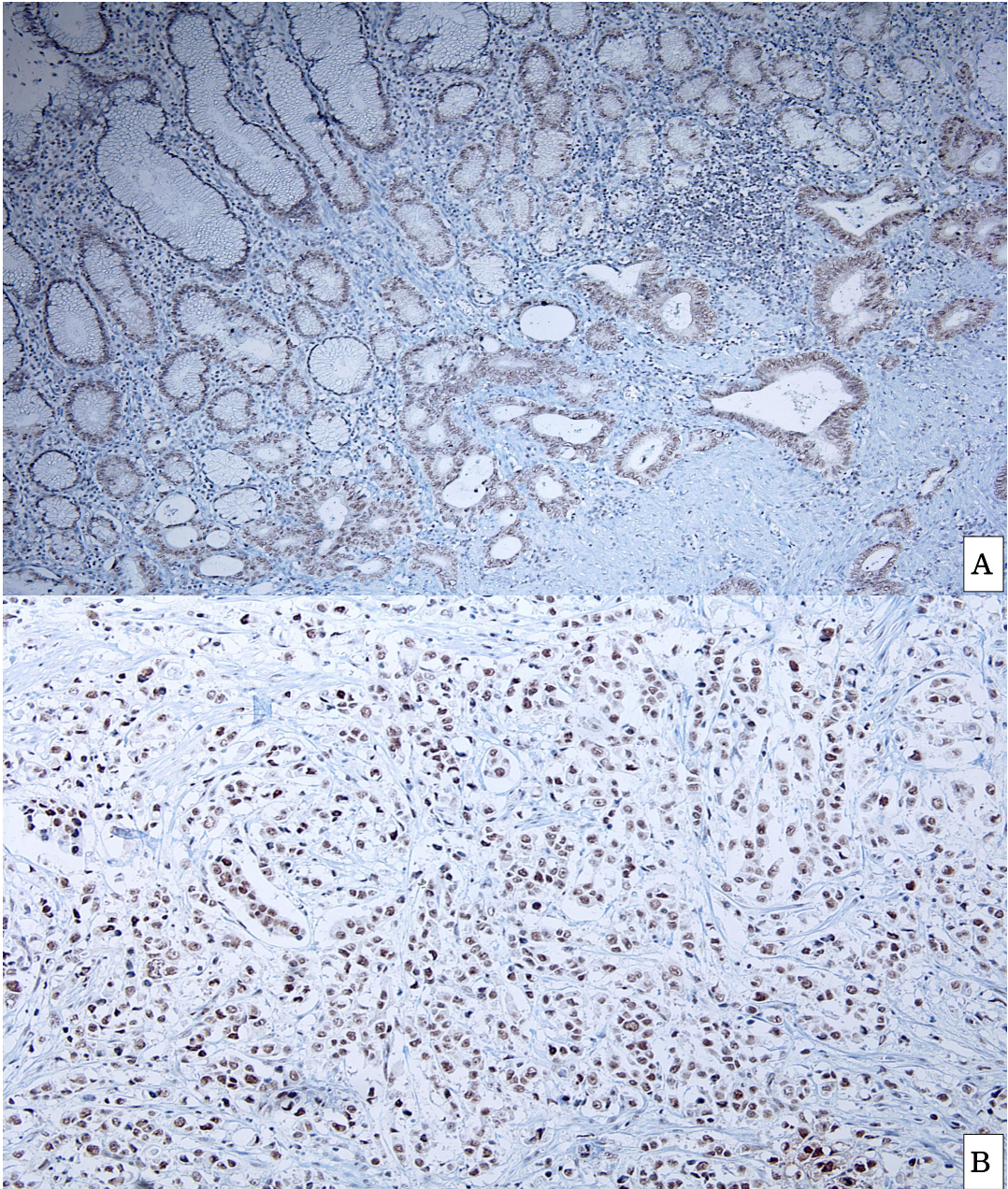


Fig. 1. Immunostaining for EZH2 shows high expression in normal gastric mucosa (upper left of A), intestinal type (lower right of A) and diffuse type (B) of gastric adenocarcinoma.

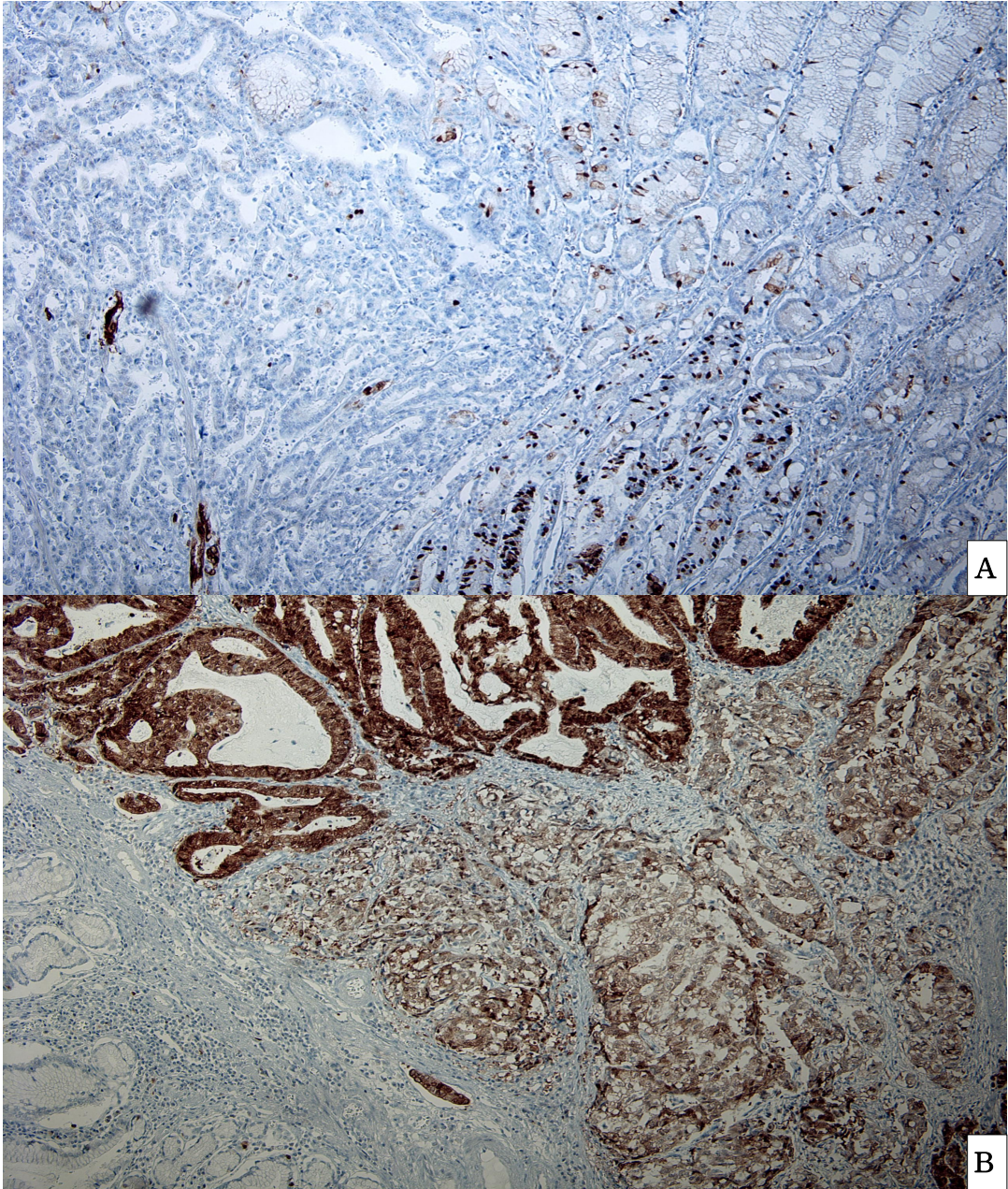


Fig. 2. Immunostaining for p16 shows focal positive in normal gastric mucosa (right of A) and negative (left of A) or positive (B) in gastric adenocarcinoma.

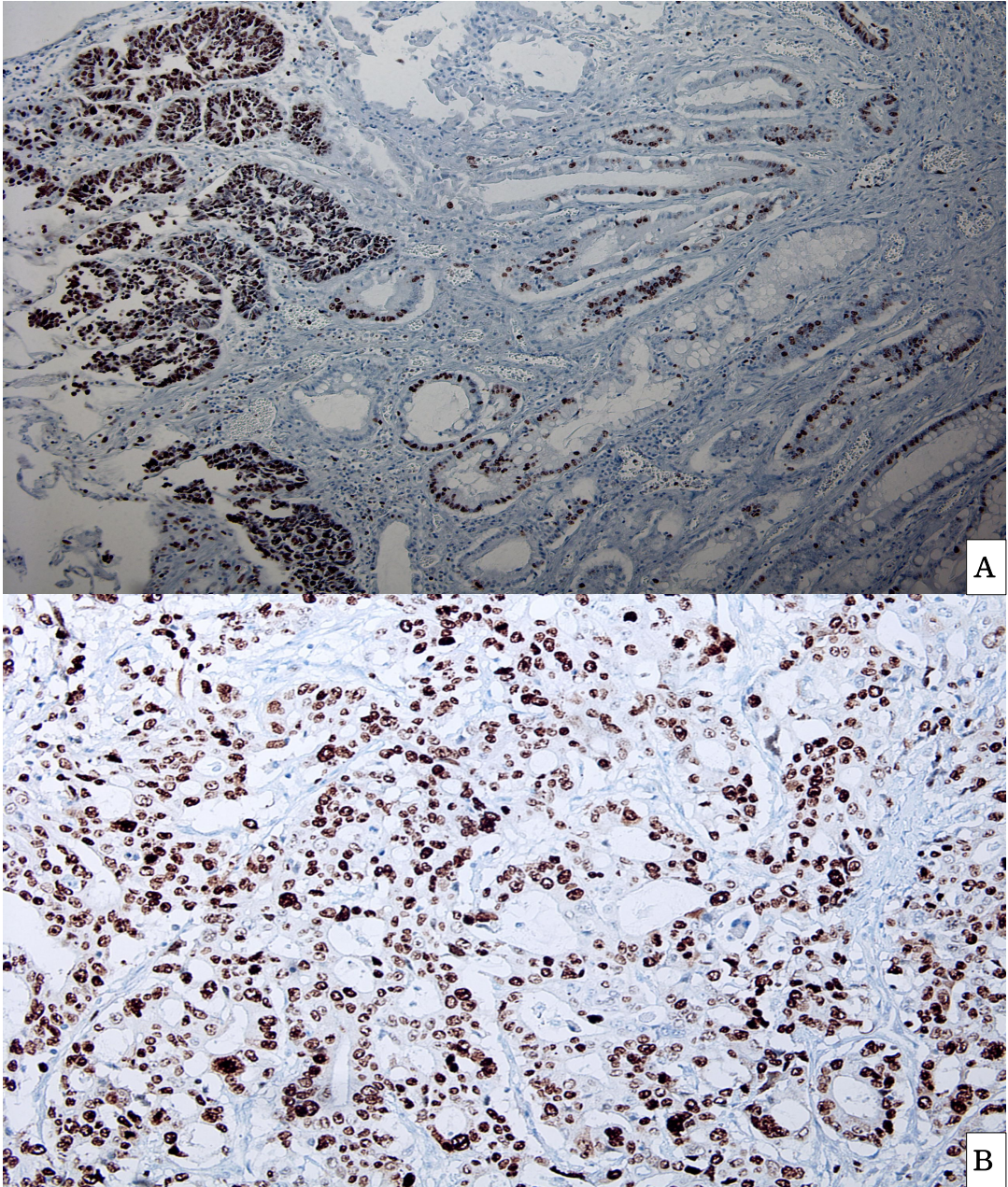


Fig. 3. Immunostaining for Ki-67 shows focal positive in normal gastric mucosa (right of A) and positive (score 3, left of A and B) in gastric adenocarcinoma.

저작물 이용 허락서

학 과	의 학 과	학 번	20097222	과 정	박 사
성 명	한글: 최 명 자 한문: 崔 明 子 영문: Choe, Myoung Ja				
주 소	광주광역시 서구 마북동 백석길22-23 상무자이@106-803호				
연락처	e-mail : cmj505@hanmail.net				
논문제목	한글: 위 샘암종에서 EZH2, p16, Ki-67 발현의 의의 영문: Significance of EZH2, p16 and Ki-67 expression in gastric adenocarcinoma				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함.
다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.






동의여부 : 동의 (0) 반대 ()

2013년 8월

저작자: 최 명 자 (인)

조선대학교 총장 귀하

최명자의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	기근홍	
위원	조선대학교	교수	임성철	
위원	조선대학교	교수	김은영	
위원	조선대학교	교수	홍란	
위원	조선대학교	교수	이미자	

2013년 6월

조선대학교 대학원